Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über Spironolactone und seine Metaboliten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Friedebert Weist
aus Nürnberg

1964

29

1964 N 124

Voll Dankbarkeit

meinen lieben Eltern

gewidmet

Dekan: Professor Dr. med. Gerhard Theissing

Referent: Prorektor Professor Dr. med. Norbert Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 2. 1964

Sonderdruck aus:

»ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG«

»DRUG RESEARCH«

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 14, 699—705 (1964)

Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Erlangen; Direktor: Professor Dr. N. Henning

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des 3'-(3-Oxo-7α-acetylthio-17β-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-propinsäure-γ-lactons und seiner Metaboliten beim Menschen*)

Von L. Zicha, F. Weist**), Scheiffarth und E. Schmid

Die Pharmakodynamik von Steroiden ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Resorption, Verteilung und Eiweißbindung einerseits, sowie biologischer Umbau im Steroidskelett und Inaktivierung durch bestimmte Esterradikale andererseits bestimmen Beginn, Maximum und Dauer der Effekte. Bei zahlreichen Pharmaka ist jedoch noch die Frage offen, ob der pharmakodynamische bzw. klinisch-therapeutische Effekt auf die applizierte Substanz selbst oder im Organismus entstandene Derivate zurückzuführen ist. Als Beispiel sei die Metabolisierung von bestimmten Pyrazolon-Derivaten erwähnt [33]. Bezüglich der Spirolactone und insbesondere des 3'-(3-Oxo-7α-acetylthio-17β-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-propionsäure-γ-lactons (Spironolacton, Aldactone®†) liegen bisher zahlreiche Untersuchungsergebnisse vor, die sich mit den klinischen Effekten und dem Wirkungsmechanismus, d. h. insbesondere mit der kompetitiven Hemmung von Aldosteron im Bereiche der Erfolgsorgane

*) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

**) D 29

†) Hersteller: C. F. Boehringer & Soehne G.m.b.H., Mannheim-Waldhof.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK

befassen [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 37, 38, 42, 43, 47, 48, 49], wobei auch im Plasma ein derartiger Mechanismus nachgewiesen wurde [7]. Dagegen ist über den Stoffwechsel des Spironolactons nur wenig bekannt. Gochman u. Gantt [13] konnten im Serum einen in 65%iger H_2SO_4 fluoreszierenden Abkömmling, ein Des-Thioacetyl-Δ_6-Derivat des Spironolactons (Aldadien) nachweisen, der auch Bauer u. Mitarb. [1] als Bezugssubstanz für ihre klinischen Versuche diente. Ob darüber hinaus weitere Metaboliten des Spironolactons beim Menschen auftreten, war bisher nicht bekannt. Abgesehen von den Untersuchungen von Gerhards u. Engelhardt [11b] fehlen Angaben über Spironolacton-Metaboliten im Harn. Auch diesen Autoren gelang jedoch keine wesentlich über das bisher Bekannte hinausgehende Feststellung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher nach weiteren Stoffwechselprodukten des Spironolactons gesucht werden. Ferner blieb zu klären, welche Mengen des applizierten Spironolactons im Harn wieder ausgeschieden werden und inwieweit sich auch nach seiner rectalen Applikation Metaboliten im Harn nachweisen lassen. Da sich uns in anderem Zusammenhang die Dünnschichtchromatographie (DC) zur Darstellung kleinster Steroidmengen bewährt hatte [9, 35, 36, 44, 45, 46] wobei das Verfahren auch zur Aldosteron-Bestimmung angewendet wurde [46], schien sie uns auch für die Bearbeitung dieser Frage geeignet. Neben der qualitativen Routinemethode nach Stahl [39, 40, 41] kamen zusätzlich spezielle dünnschichtchromatographische Varianten zur Anwendung, die einerseits einen Anhalt für semiquantitative Aussagen geben, andererseits aber auch die Isolierung größerer Mengen von Spironolacton und seiner Metaboliten gestatten.

Methodik

10 Versuchspersonen nahmen eine einmalige Dosis von 500—1000 mg Spironolacton (5—10 Tabletten Aldactone zu 100 mg) morgens nüchtern ein. Für die rectale Infusion verwendeten wir 1 g Spironolacton in 300 cm³ einer 10%igen alkoholischen Suspension (3 Probanden). Der Harn wurde zunächst stündlich, später in 3-h-Portionen fraktioniert gesammelt. Die Versuchsdauer betrug bis zu 72 h. Sofern das Untersuchungsmaterial nicht sofort aufgearbeitet werden konnte, wurden die Proben in der Tiefkühltruhe bei −20° C nicht länger als 10 Tage aufbewahrt.

Von zahlreichen getesteten organischen Lösungsmitteln bewährte sich zur Extraktion des reinen, im Organismus unveränderten Spironolactons aus dem Harn insbesondere CCl_4. Zur gleichzeitigen Extraktion von Spironolacton, Aldadien sowie weiteren Metaboliten war dagegen eine Mischung von CCl_4 : $CHCl_3$ im Verhältnis 1 : 1 bzw. 1 : 4 besser geeignet. Die Extrakte wurden bei 60° C im Wasserbad unter Durchleiten von N_2 zur Trockne eingeengt und in 200 mm³ des jeweiligen Extraktionsmittels gelöst. Reinsubstanz und Ex-

trakte wurden in verschiedenen Mengen auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Zur Herstellung der Platten bedienten wir uns des von Stahl [39, 40, 41] angegebenen Verfahrens. Neben der Standardtechnik erfolgten auch Trennungen auf Kieselgelplatten mit Zusatz von Na-Fluoreszein oder Rhodamin B. Um einen Einfluß der verwendeten Extraktionsmittel auf Spironolacton und seine Metaboliten auszuschließen, wurden zur Ermittlung der Eliminationsmaxima neben den nicht vorbehandelten Harnen auch die von 1 l auf 0,1 ml eingeengten Lösungsmittel direkt auf die Dünnschichtplatten aufgetragen.

Von den in der Steroidchemie üblichen Farbreaktionen hat sich das Besprayen mit H_3PO_4 und anschließend mit Phosphormolybdänsäure zur Anfärbung des Spironolactons und seiner Metaboliten für die Auswertung bei Tageslicht als besonders empfindlich erwiesen. 0,05 µg ließen sich hierbei noch feststellen. Mit Hilfe von 65%iger H_2SO_4, 40%iger H_3PO_4 oder $SbCl_3$ in CH_3COOH im Verhältnis 1 : 1 gelöst und nachfolgender Erhitzung auf 120° C für die Dauer von 20 min konnte die untere Nachweisgrenze des Spironolactons bei Betrachtung der Dünnschichtplatten unter der Wood'schen Lampe sogar auf 0,025 µg gesenkt werden. Die Ergebnisse verschiedener Farbreaktionen des Aldadiens und Spironolactons sind in Tab. 1 angegeben. Die R_f-Werte nach Anwendung einer Reihe von Laufmitteln lassen sich der Tab. 2 entnehmen.

Zur Isolierung einzelner Metaboliten aus Körperflüssigkeiten wurden 40- bzw. 60-cm-Platten mit unterschiedlicher Kieselgel-G-Schichtdicke hergestellt. Die Laufstrecken betrugen dabei bis zu 55 cm. Es wurde mit aufsteigender und absteigender Methode gearbeitet. Die Trennungen erfolgten in gesättigten Kammern. Laufmittel und Färbeverfahren entsprachen denen der Standardplatten. Die zu untersuchenden Harnextrakte wurden zur Banddchromatographie aufgetragen. Nach Färbung der auf beiden Seiten dieses Banddchromatogrammes mitgelaufenen Testsubstanzen sowie des gleichen Harnextraktes, der auch im Mittelteil der Platten aufgetragen war, wurden die einzelnen ungefärbten Fraktionen vorsichtig von der Platte abgekratzt, mit $CHCl_3 : CCl_4 = 1 : 1$ eluiert, danach zentrifugiert und zur Trockne eingedampft. Für die Ermittlung der Fluoreszenzspektren einzelner Metaboliten wurde die Trockne jeweils in 3 ml 65%iger H_2SO_4 und in 3 ml $SbCl_3$ in $CH_3COOH = 1 : 1$ aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des mit 2 Prismenmonochromatoren ausgestatteten Zeiß'schen Spektralfluorometers. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der jeweiligen Anregungs- und Emissionsmaxima wurde ermittelt.

In weiteren Versuchsreihen wurden die einzelnen Metaboliten nach der Anfärbung auf Dünnschichtplatten mit $SbCl_3$ und H_2SO_4 eluiert und ihre Fluoreszenzspektren mit den Ergebnissen der ungefärbt eluierten Metaboliten verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend der angegebenen Methodik wurden die einzelnen Harnextrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die nach Anwendung verschiedener Steigmittel errechneten R_f-Werte des Spironolactons, des Aldadiens und der bisher noch nicht identifizierten Metaboliten sowie die Farbtöne nach den erwähnten Farbreaktionen bei Tageslicht und unter der Wood'schen Lampe sind in den Tab. 1, 2 u. 3 gegenübergestellt. Es zeigte sich hierbei, daß in Abhängigkeit von dem jeweiligen Steigmittel außer unverändertem Aldacton, das nur in geringen Mengen zur Ausscheidung gelangte, Aldadien und eine größere Anzahl weiterer Metaboliten im Harn ausgeschieden werden. Hierbei gelang es, sieben dieser Metaboliten

Tab. 1

Nr.	Reaktionsmittel	Nachbehandlung	Farbtönungen*) Spironolacton UV (360 mμ)	Spironolacton Tageslicht	Aldadien UV (360 mμ)	Aldadien Tageslicht
1	ungefärbt (Spontanfluoreszenz)	—	gelbgrün	—	grüngelb	—
2	65%ige H_2SO_4	20 min/110° C	gelb mit braunem Ring	braunbeige	gelb mit braunem Ring	braunbeige
3	$SbCl_3 : CH_3COOH = 1 : 1$	10 min/70° C ca. 30 min/25° C	grüngelb	hellbraun orangebraun mit gelbem Hof	grüngelb	gelbbraun
4	40%ige H_3PO_4	10 min/70° C 20 min/110° C	gelbgrün braun	— beige	gelbgrün gelbbraun	zitronengelb beige
5	$P_2O_5 \cdot 24\ MoO_3 \cdot x\ H_2O$ in 5%iger methanol. Lsg.	20 min/150° C	—	blaugrau	—	braun
6	$ZnCl_2$ gesättigt, in wäßriger Lösung	10 min/70° C	gelb mit orangenem Hof	braun mit grün-gelbem Hof	braun mit gelbem Hof	ocker
	65%ige $H_2SO_4 = 1 : 1$	20 min/110° C	braun mit beigem Hof	braun	braun mit beigem Hof	braun
7	$ZnCl_2 : CH_3COOH = 1 : 1$	20 min/110° C	orangegelb	gelb	gelbgrün	zitronengelb

8	CCl_3COOH in $CHCl_3$	20 min/110° C	grünviolett	—	grün	—
9	Lugol'sche Lösung	10 min/70° C	braungrün	gelb	braun	gelb
10	$ZnCl_2$ gesättigt, in wäßr. Lsg.	10 min/70° C 20 min/110° C	blaßgelb grüngelb	— gelb	grün gelbgrau	— gelb
11	Bromkresolgrünlösung + 65%ige H_2SO_4=1 : 1 (durch Bromkresolgrün rosavioletter Grundton)	10 min/70° C	orangeroter Ring mit gelbem Hof u. zentral. gelbem Fleck	weinroter Ring mit grünem Hof u. zentral. grünem Fleck	zitronengelb	braungelb
		20 min/120° C	braunviolett	braun	braunviolett	braun
12	1 3,6-Trichlortetrazolium (Vorschr. Merck)	10 min/70° C	schwarz	karminrot	—	—
13	wie Nr. 12, jedoch mit 65%ig. H_2SO_4 nachbehandelt	10 min/70° C	rotbraun	rotbraun	gelb	gelb
14	KOH : H_2O : C_2H_5OH=1 : 1 : 3 mit 1,3-Dinitrobenzol nachbehandelt	20 min/70° C	—	braunschwarz	—	blaulila
15	2,4-Dinitrophenylhydrazin in 5n HCl + 65%ige H_2SO_4=1 : 1	10 min/70° C	rotbraun	braunorange	gelb	gelb

*) Weitere geprüfte Farbreaktionen waren zur Charakterisierung der beiden Spirolactone weniger geeignet, da die Farbtönungen inkonstant waren.

Tab. 2: Alle Steigmittelsysteme wurden in einer gesättigten Kammeratmosphäre bei 21—24° C auf 0,2 mm dicken Kieselgel G-Schichten getestet. Für die aufsteigende Entwicklung wurde eine Eintauchtiefe der Platten von 1 cm, für die absteigende Technik ein Gefälle von 27% konstant gewählt.

Nr.	Steigmittelsystem:			Lauf-str.	R_f-Werte	
	aufsteigende Chromatographie				Spirono-lacton	Alda-dien
1	CH_3OH	: CCl_4	= 1 : 3	15 cm	0,65	0,63
2	CH_3OH	: CCl_4	= 4 : 96	15 cm	0,30	0,25
3	CH_3OH	: CH_2Cl_2	= 1 : 4	15 cm	0,92	0,89
4	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 1 : 1	15 cm	0,87	0,83
5	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 19 : 81	15 cm	0,75	0,73
6	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 7 : 93	15 cm	0,66	0,62
7	CH_3OH	: $C_2H_5{\cdot}O{\cdot}C_2H_5$	= 2 : 1	15 cm	0,75	0,70
8	CH_3OH	: $C_2H_5{\cdot}O{\cdot}C_2H_5$	= 1 : 3	15 cm	0,46	0,44
9	$CHCl_3$	: $CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_3$	= 7 : 3	15 cm	0,65	0,61
10	$CHCl_3$	: $CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_3$	= 3 : 7	15 cm	0,72	0,74
11	$CHCl_3$	: C_2H_5OH	= 4 : 1	15 cm	0,89	0,87
12	$CHCl_3$	: C_2H_5OH	= 1 : 4	15 cm	0,75	0,73
13	$C_2H_5{\cdot}CH_2OH$	: CCl_4	= 3 : 7	15 cm	0,47	0,55
14	$C_2H_5{\cdot}CH_2OH$	: CCl_4	= 15 : 85	15 cm	0,30	0,37
15	$C_2H_5{\cdot}CH_2OH$	: CCl_4	= 5 : 95	15 cm	0,17	0,23
16	$CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_3$	: CCl_4	= 3 : 7	15 cm	0,61	0,55
17	$CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_3$	: CCl_4	= 15 : 85	15 cm	0,40	0,33
18	$CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_3$	: CCl_4	= 5 : 95	15 cm	0,22	0,21
19	$C_2H_5{\cdot}CH_2OH$	: CH_2Cl_2	= 1 : 3	15 cm	0,88	0,87
20	$CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_3$	:	= 1 : 4	15 cm	0,40	0,37
21	$CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_3$	:	= 4 : 1	15 cm	0,75	0,79
22	$CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_3$	: $HCO{\cdot}NH_2$	= 3 : 7	15 cm	0,93	0,98
23	CH_3COOH (96%ig)			15 cm	0,65	0,65
24	$CH_3CO{\cdot}OC_2H_5$	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 95 : 5	15 cm	0,23	0,22
25	$CH_3COOH : NH_4OH$ (25%ig) : $CH_2OH{\cdot}CH_2{\cdot}O{\cdot}CH_3$		= 150 : 35 : 65	15 cm	0,73	0,76
26	$CCl_4 : n{-}C_7H_{15}OH$:	$: HCO{\cdot}N(CH_3)_2$	= 213 : 35 : 2	15 cm	0,23	0,21
27	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 19 : 81	30 cm	0,74	0,71
28	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 5 : 95	30 cm	0,65	0,60
29	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 7 : 93	30 cm	0,67	0,63
30	CH_3OH	: $C_2H_5{\cdot}O{\cdot}C_2H_5$	= 2 : 1	30 cm	0,70	0,68
31	$CHCl_3$	: C_2H_5OH	= 1 : 4	30 cm	0,71	0,70
32	$CHCl_3$	: CCl_4	= 1 : 4	30 cm	0,65	0,60
33		: CH_3OH	= 90 : 10	30 cm	0,21	0,20
34		:	= 1 : 4	30 cm	0,71	0,65
	absteigende Chromatographie					
35	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 19 : 81	15 cm	0,72	0,74
36	CH_3OH	: $CH_2Cl{\cdot}CH_2Cl$	= 7 : 93	15 cm	0,64	0,60
37	$C_2H_5{\cdot}CH_2OH$	: CCl_4	= 15 : 85	15 cm	0,41	0,35

Tab. 3

Substanz	Farbtönungen				R_f-Werte	
	SbCl 110° C/20 min		H_2SO_4 110° C/20 min			
	UV (360 mμ)	Tageslicht	UV (360 mμ)	Tageslicht	A*)	B*)
9 Aldadien	gelborange	hellblau	braungelb	braun	0,17	0,55
8**)	violett	blau	—	—	0,68	0,50
7	braungelb	braungrau	grünbraun	—	0,64	0,47
6	gelb	braungelb	gelbbraun	gelbbraun	0,56	0,39
5	gelb	gelb	gelbbraun	zart gelb	0,51	0,34
4	karmin	gelb	stahlblau	rotbraun	0,43	0,27
3	blaurosa	grau	tiefblau	—	0,35	0,22
2	violett	blaugrau	graublau	grau	0,31	0,18
1	rosa	blauviolett	graublau	grau	0,27	0,16
0†)	beige	—	graublau	grau	0,21	0,12

*) der Spalte A liegt das Steigmittelgemisch $CH_3OH : C_2H_4Cl_2 = 19 : 81$ bei absteigender, der Spalte B das von $CH_3OH : C_2H_4Cl_2 = 35 : 65$ bei aufsteigender Technik zugrunde.

**) Bei der Substanz 8 handelt es sich um eine bisher noch nicht identifizierte, auch im Leerwert vorkommende Verbindung, die jedoch nach Spironolacton-Gabe vermehrt zur Ausscheidung gelangt.

†) Substanz 0 liegt in so geringen Mengen vor, daß der Versuch der Reindarstellung zunächst aussichtslos erscheinen muß.

bei sämtlichen untersuchten Fällen mit Sicherheit festzustellen und auf Grund ihres unterschiedlichen chromatographischen und färberischen Verhaltens zu charakterisieren. Die Identifizierung ist noch im Gange. Zwei weitere dünnschichtchromatographisch abzutrennende Fraktionen kamen nur in geringen Mengen vor und waren wohl deshalb nicht in jedem Falle nachweisbar. Eine Trennung von Spironolacton und Aldadien gelang hierbei erstmalig auch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, besitzen die beiden Spirolactone nur in den Systemen Propanol in CCl_4, bzw. Iso-Propanol in CCl_4, unterschiedliche R_f-Werte, während sie in allen anderen Systemen etwa die gleichen Laufstrecken besitzen. Bislang war eine Trennung dieser Substanzen nur papierchromatographisch möglich (Gochmann u. Gantt [13] sowie Kaiser*)). Die Anregungs- und Fluoreszensspektren der Substanzen Nr. 9, 6, 4 und 3 (nicht korrigierte Instrumentenwerte) sind in Abb. 1 wiedergegeben. Die R_f-Werte sowie die beobachteten Farbtönungen nach Anwendung unserer Stan-

*) persönliche Mitteilung.

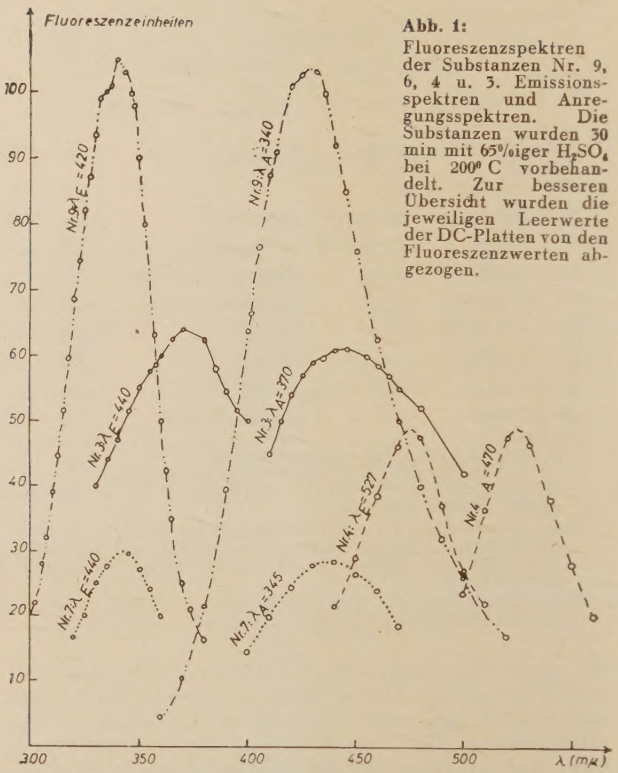

Abb. 1:
Fluoreszenzspektren der Substanzen Nr. 9, 6, 4 u. 3. Emissionsspektren und Anregungsspektren. Die Substanzen wurden 30 min mit 65%iger H_2SO_4 bei 200° C vorbehandelt. Zur besseren Übersicht wurden die jeweiligen Leerwerte der DC-Platten von den Fluoreszenzwerten abgezogen.

dardfärbungen sind für sämtliche gefundenen Metaboliten in Tabelle III zusammengefaßt. Die Abhängigkeit der Anregungs- und Emissionsmaxima von der Temperatur sowie der Anfärbung auf Dünnschichtplatten ist in Tab. 4 dargestellt, wobei folgende Messungen vorgenommen wurden:

1. H_2SO_4-Spektren 2 h bei Zimmertemperatur;
2. H_2SO_4-Spektren nach Erhitzen 30 min auf 110° C;
3. $SbCl_3$-Spektren 2 h bei Zimmertemperatur;
4. $SbCl_3$-Spektren nach Erhitzen 30 min auf 110° C;
5. Nach Farbreaktion von der DC-Platte mit H_2SO_4 eluiert;
6. Nach Farbreaktion von der DC-Platte mit $SbCl_3$ eluiert.

Die Fluoreszensspektren der bereits auf der Dünnschichtplatte angefärbten und danach eluierten Metaboliten in $SbCl_3$ und H_2SO_4 waren einheitlich, sofern die Eluate nicht zusätzlich auf 110° C erhitzt wurden.

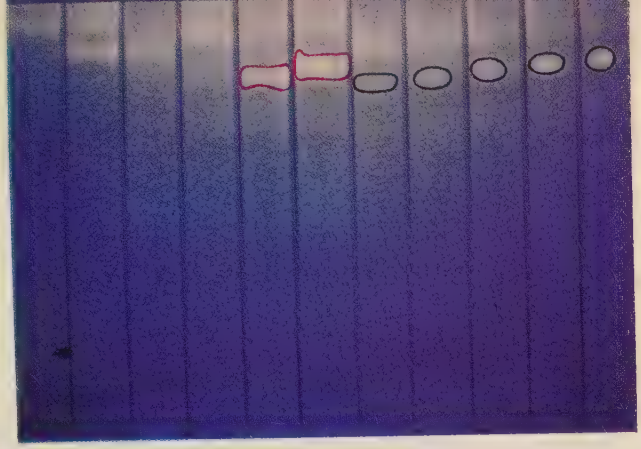

Abb. 2

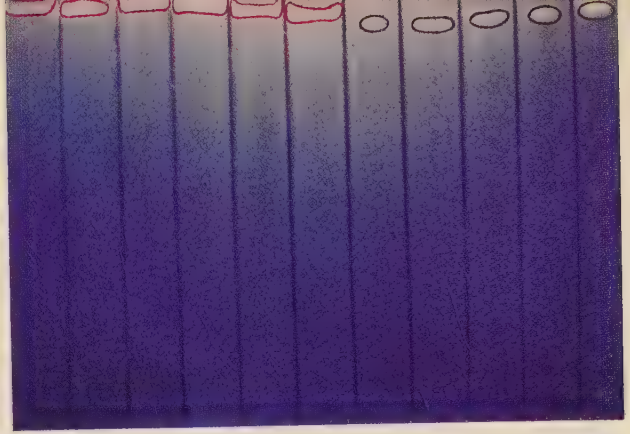

Abb. 3

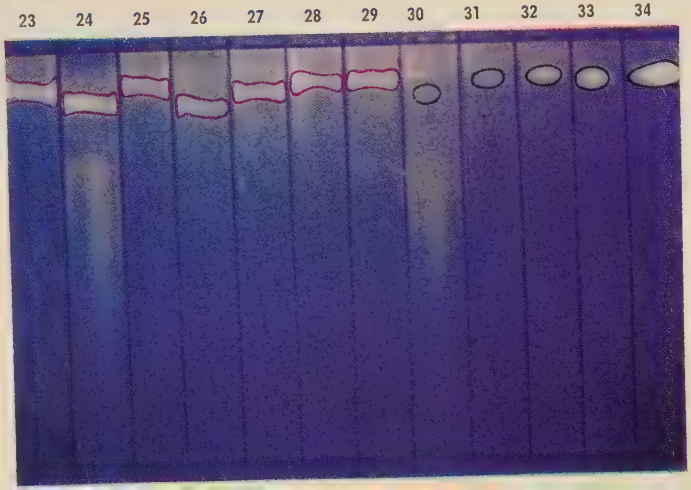

Abb. 2—4: Nativharnchromatogramme. Es wurde jeweils $^1/_{100}$ der Harnmenge pro h aufgetragen.

Spalte 1: Leerwert		Spalte 18: 0,25 µg Aldadien	
„ 2: + 1 µg Aldadien		„ 19: 0,5 „ „	
„ 3: Harn 1. h p. Appl.		„ 20: 0,75 „ „	
„ 4: Harn 2. h „ „		„ 21: 1,0 „ „	
„ 5: Harn 3. h „ „		„ 22: 2,5 „ „	
„ 6: Harn 4. h „ „		„ 23: Harn 18. 21. h p. A.	
„ 7: 0,1 µg Aldadien		„ 24: „ 21. 24. h „ „	
„ 8: 0,25 „ „		„ 25: „ 24. 32. h „ „	
„ 9: 0,5 „ „		„ 26: „ 32. 40. h „ „	
„ 10: 0,75 „ „		„ 27: „ 40. 48. h „ „	
„ 11: 1,0 „ „		„ 28: „ 48. 56. h „ „	
„ 12: Harn 5. h p. A.		„ 29: „ 56. 72. h „ „	
„ 13: „ 6. h „ „		„ 30: 0,1 µg Aldadien	
„ 14: „ 6. 9. h „ „		„ 31: 0,5 „ „	
„ 15: „ 9. 12. h „ „		„ 32: 1,0 „ „	
„ 16: „ 12. 16. h „ „		„ 33: 5,0 „ „	
„ 17: „ 15.—18. h „ „			

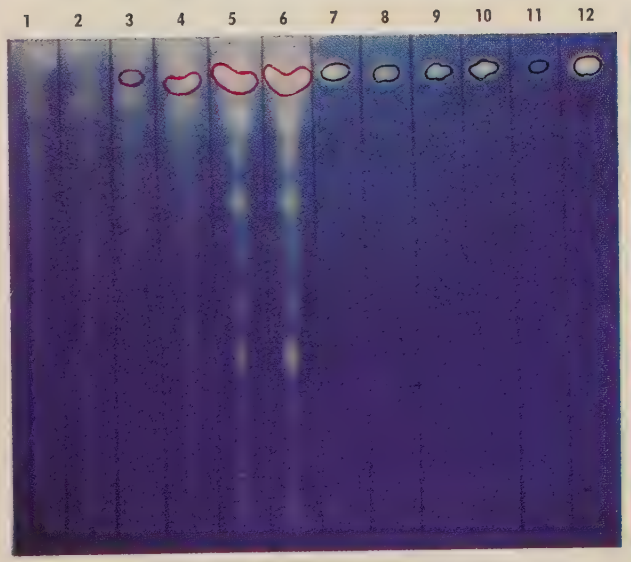

Abb. 5

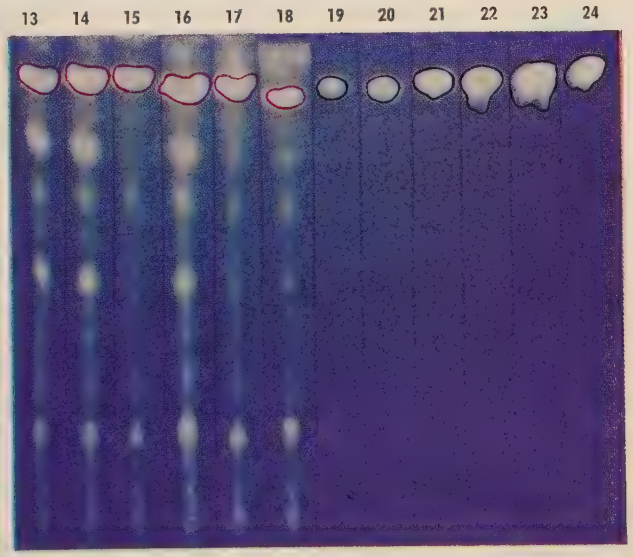

Abb. 6

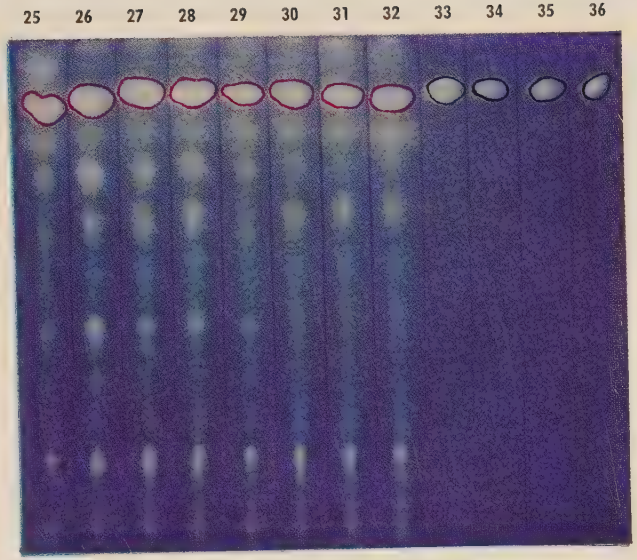

Abb. 7:

Abb. 5—7: Extraktchromatogramme. Es wurde jeweils 1/3 der Harnmenge extrahiert und vom Extrakt je 1/16 aufgetragen.

Spalte 1: Leerwert		Spalte 19: 0,5 µg Aldadien	
„ 2: „ + 0,1 µg Aldadien		„ 20: 1,0 „ „	
„ 3: Extr. 1. h p. Appl.		„ 21: 2,5 „ „	
„ 4: „ 2. h „ „		„ 22: 5,0 „ „	
„ 5: „ 3. h „ „		„ 23: 7,5 „ „	
„ 6: „ 4. h „ „		„ 24: 10,0 „ „	
„ 7: 1,0 µg Aldadien		„ 25: Extr. 18.—21. h p. A.	
„ 8: 0,25 „ „		„ 26: „ 21.- 24. h „ „	
„ 9: 0,5 „ „		„ 27: „ 24.—32. h „ „	
„ 10: 0,75 „ „		„ 28: „ 32.—40. h „ „	
„ 11: 0,1 „ „		„ 29: „ 40.—48. h „ „	
„ 12: 5,0 „ „		„ 30: „ 48.—56. h „ „	
„ 13: Extr. 5. h p. A.		„ 31: „ 56.—64. h „ „	
„ 14: „ 6. h „ „		„ 32: „ 64. -72. h „ „	
„ 15: „ 6.- 9. h „ „		„ 33: 1,0 µg Aldadien	
„ 16: „ 9.—12. h „ „		„ 34: 0,25 „ „	
„ 17: „ 12.—15. h „ „		„ 35: 0,5 „ „	
„ 18: „ 15. 18. h „ „		„ 36: 0,5 „ „	

Abb. 11: Metabolitentrennung. Substanzen 2—9. Die Abbildung gibt die Farbtönungen, wie sie dem Auge unter der W o o d ' schen Lampe erscheinen, nur sehr begrenzt wieder.

Das Anregungsmaximum lag bei den eluierten gefärbten Substanzen bei 460—475 mμ, das Emissionsmaximum um 520 mμ. Das zusätzliche Erhitzen dieser Proben führte zu einer Veränderung der Fluoreszensspektren (Tab. 4).

Tab. 4: Die Angaben der Anregungsmaxima (Max_A) und der Emissionsmaxima (Max_E) verstehen sich in mμ. Die Erhitzungsdauer bei 110° C betrug 30 min.

Reaktionsmittel: SbCl

Substanz	auf der DC-Platte angefärbt, mit $SbCl_3$ eluiert				von der DC-Platte ungefärbt abgekratzt, dann Farbreaktion mit $SbCl_3$			
	Zimmertemperatur		auf 110° C erhitzt		Zimmertemperatur		auf 110° C erhitzt	
	Max_A	Max_E	Max_A	Max_E	Max_A	Max_E	Max_A	Max_E
9 (Aldadien)	472	530	474	530	480	530	478	530
7	—	—	—	—	480	530	480	535
6	470	530	473	530	480	530	475	535
5	470	527	474	533	480	535	430	510
4	470	527	472	530	470	535	432	525
3	470	527	470	525	—	—	480	535
2	470		476	525	—	—	—	—
Spirono-lacton	475	527	—	—	475	527	482	525

Reaktionsmittel: H_2SO_4

Substanz	auf der DC-Platte angefärbt mit H_2SO_4 eluiert				von der DC-Platte ungefärbt abgekratzt, dann Farbreaktion mit H_2SO_4			
	Zimmertemperatur		auf 110° C erhitzt		Zimmertemperatur		auf 110° C erhitzt	
	Max_A	Max_E	Max_A	Max_E	Max_A	Max_E	Max_A	Max_E
9 (Aldadien)	460	520	384	425	480	525	384	425
7	460	515	388	425	—	—	387	425
6	460	525	382	425	460	515	387	425
5	460	515	386	420	460	515	386	425
4	470	520	389	425	385	510	385	425
3	465	520	387	424	455	500	420	510
2	—	—	380	430	—	—	—	—
Spirono-lacton	470	520	—	—	475	520	472	520

Die Anregungs- und Emissionsmaxima der einzelnen auf der Dünnschichtplatte angefärbten und eluierten Metaboliten bei Zimmertemperatur waren einheitlich. Somit ist bei Kenntnis der spezifischen Aktivität der einzelnen Metaboliten auch ihre quantitative Bestimmung möglich. Bis zur endgültigen Identifizierung der gefundenen Substanzen wurden die für Metaboliten ermittelten Werte auf Aldadien bezogen, so daß sie nach der Aufstellung von entsprechenden

Eichkurven auf absolute Metabolitenwerte umgerechnet werden können. Damit ergibt sich mittels des relativ einfachen Verfahrens der Dünnschichtchromatographie die Möglichkeit einer simultanen quantitativen Bestimmung von applizierter Substanz und deren Metaboliten, ohne die zeitraubenden und oft aufwendigen säulenchromatographischen Verfahren anwenden zu müssen. Auch gegenüber der Papierchromatographie bestehen große Vorteile wegen der möglichen Anwendbarkeit hochprozentiger Säuren und insbesondere wegen der wesentlich größeren Trennschärfe pro Zeiteinheit.

Schließlich besteht die Möglichkeit, Harn auch direkt, d. h. ohne Extraktion auf Dünnschichtplatten zur Trennung aufzutragen. In den Abb. 2—7 sind die Ergebnisse eines derartigen Versuches der dünnschichtchromatographischen Entwicklung von Extrakten derselben Harnproben gegenübergestellt. Dabei wurde die Versuchsperson oral mit 1000 mg Spironolacton belastet. Im unveränderten Harn fanden sich dabei maximal 11,4 μg/ml, während die Auswertung der Ex-

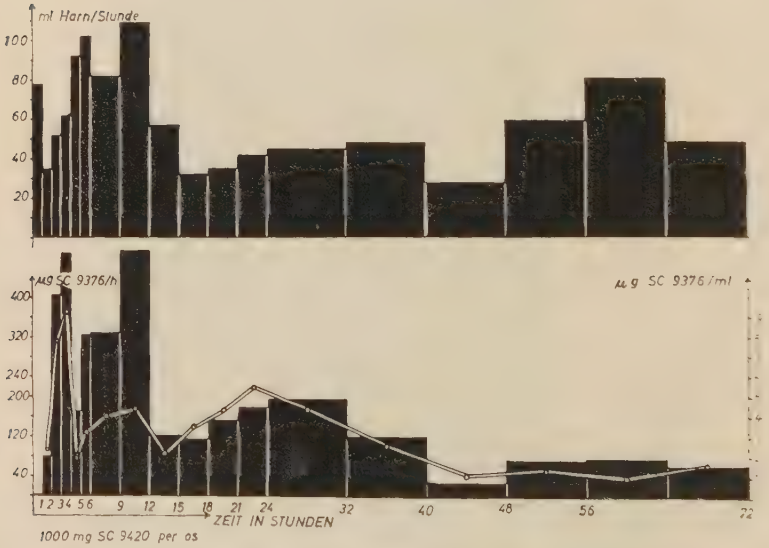

Abb. 8: Aldadien-Werte im Harn, ermittelt nach dem beschriebenen Extraktions- und Bestimmungsverfahren. Die Versuchsperson erhielt 1000 mg Spironolacton per os. Die Säulen der oberen Darstellung geben die Verhältnisse der Urinausscheidung, die der unteren diejenigen der Aldadien-Elimination in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Die Kurve der unteren Darstellung zeigt den Aldadien-Spiegel im Harn in Abhängigkeit von der Zeit.

traktreihe ein Konzentrationsmaximum des Urins von 9.4 μg/ml ergab. Hiermit ist gleichzeitig die Wiedergewinnungsrate für Aldadien von 81—87%, wie sie nach Gochmann u. Gantt [13] bei Extraktionen mit CH_2Cl_2 aus dem Plasma Gültigkeit hat, auch für die Aldadien-Extraktion mit $CCl_4 : CHCl_3 = 1 : 1$ aus dem Harn erreicht. Die Abb. 8—10 zeigen die semiquantitativ ermittelten und auf Aldadien-Farbintensitätsvergleich bezogenen Harnwerte von Spironolacton bei zwei Versuchspersonen nach einer Gabe von 500 bzw. 1000 mg Spironolacton per os.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des Harnes von Versuchspersonen, die eine rectale Infusion mit 1000 mg Spironolacton erhielten, haben gezeigt, daß prinzipiell die gleichen Metaboliten im Harn zur Ausscheidung gelangen. Allerdings sind die Eliminationsgipfel niedriger und kommen später zur Darstellung.

Außerdem ermöglicht die Dünnschichtchromatographie auch Trennungen von größeren Mengen der zu prüfenden Substanzen, so daß sich das Verfahren

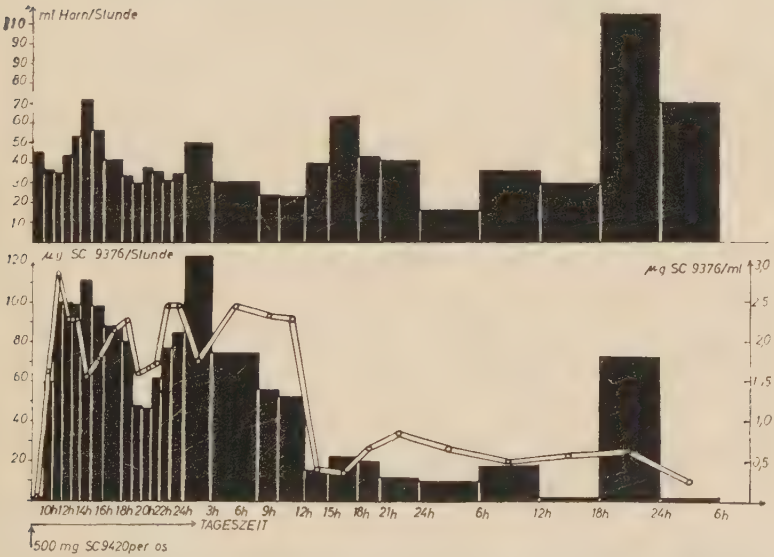

Abb. 9: Aldadien-Werte im Harn, ermittelt nach dem beschriebenen Extraktions- und Bestimmungsverfahren. Die Versuchsperson erhielt 500 mg Spironolacton per os. Die Säulen der oberen Darstellung geben die Verhältnisse der Urinausscheidung, die der unteren diejenigen der Aldadien-Elimination in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Die Kurve der unteren Darstellung zeigt den Aldadien-Spiegel im Harn in Abhängigkeit von der Zeit.

nicht nur für die Charakterisierung, sondern auch zur Isolierung von Metaboliten eignet. So wurden nach Chromatographie auf 40- und 60-cm-Platten mit größeren Schichtdicken (Abb. 11) die Fluoreszensspektren bestimmt.

Der Bestimmungsmethode, die von Gochmann u. Gantt [13] verwendet worden war und sämtlichen anderen Methoden, bei denen nur eine summarische Erfassung der auf die bekannte Ausgangssubstanz oder einen bekannten Metaboliten bezogenen Extinktionswerte erfolgt, ist das hier beschriebene Verfahren überlegen. Unter den charakterisierten Spironolacton-Stoffwechselprodukten dürfte eine Reihe bestimmter Substanzen zu erwarten sein. So bestehen grundsätzlich folgende theoretische Möglichkeiten einer chemischen Umwandlung des Spironolactons:

1. Eine Abspaltung des Thioacetylradikals am C_7 mit folgender Doppelbindung $\Delta 6$.
2. Eine eventuell reversible Aufspaltung des Lactonringes.
3. Eine Rückverwandlung der $\Delta 4$-3-Ketogruppe zu einer 3-OH-Gruppe (stoffwechselmäßig nicht sehr wahrscheinlich, da die $\Delta 4$-3-Ketogruppe einen Abbauweg im Steroidstoffwechsel darstellt).

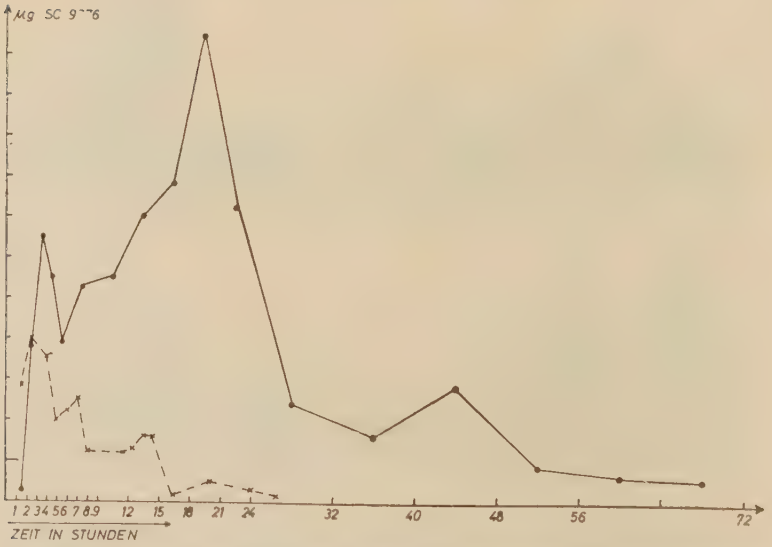

Abb. 10: Aldadien-Werte im Harn, denen die beschriebene chromatographische Trennung von Nativharnen zugrunde liegt. Die beiden Kurven geben den Aldadien-Spiegel im Harn nach einer oralen Belastung mit 1000 mg (obere Kurve) bzw. 500 mg (untere Kurve) in Abhängigkeit von der Zeit wieder.

4. Eine Abspaltung des Lactonringes mit Überführung in andere Steroide, z. B. ein 17-Ketosteroid oder Aufbau zu C_{21}-Steroiden.
5. Sekundäre Veresterung als Glukuronid oder Sulfat. Durch die nachfolgende bessere Wasserlöslichkeit wäre eine bessere Harnfähigkeit erreicht. Allerdings ist dieser Weg nicht sehr wahrscheinlich, da hochprozentige Säuren eine Hydrolyse bedingen (65%ige H_2SO_4), andererseits organische Extraktionsmittel Glukuronide nur in geringer Menge extrahieren. Für Sulfate gilt sinngemäß das gleiche, allerdings würde H_2SO_4 stabilisierend wirken.

Welche der erwähnten Möglichkeiten zutreffen, wird zur Zeit noch geprüft.

Bei den Belastungsversuchen mit Spironolacton hat es sich im übrigen gezeigt, daß bereits nach 1 h geringe Mengen unverändert im Harn ausgeschieden werden. Eventuell auftretende Metaboliten blieben hierbei noch unter der Nachweisgrenze von 0,02 μg, bezogen auf Aldadien. Quantitative Aussagen über die Elimination der Spironolacton-Metaboliten allein auf Grund der festgestellten Fluoreszenzintensitäten werden erst nach Identifizierung der entsprechenden Derivate möglich sein. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß sich die Gesamtmenge der im Harn wiedergefundenen Abkömmlinge noch wesentlich erhöht. Dies würde insbesondere dann zutreffen, wenn Löschungsphänomene (quenching) durch Esterradikale oder bestimmte Anordnung hydrophiler Gruppen vorliegen.

Bereits während der zweiten Stunde finden sich drei Metaboliten, drei weitere ab der dritten Stunde. Das Maximum der Ausscheidung fand sich während der neunten bis zwölften Stunde nach oraler Applikation. Während dieses Zeitintervalles wurden zum Teil bis zu 400 μg/h Aldadien ausgeschieden.

Die Dünnschichtchromatographie hat sich schließlich auch für die direkte chromatographische Trennung des unveränderten, nicht extrahierten Harnes bewährt, sofern die Ausscheidungsmengen 0,02 μg/ml Harn erreichten. Damit entfallen die während einer Extraktion unvermeidlichen Substanzverluste und die für einen Versuch benötigte Zeit kann weiterhin verkürzt werden.

Zusammenfassung

Es werden dünnschichtchromatographische Nachweisverfahren zur Bestimmung von 3'-(3-Oxo-7α-acetylthio-17β-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-propionsäure-γ-lacton (Spironolacton, Aldactone®) und seiner Metaboliten im Harn ausgearbeitet. Hierbei gelang auch

eine dünnschichtchromatographische Trennung von Spironolacton und seinem Des-thioacetyl-Δ_6-Derivat Aldadien. Mit Hilfe dieser Methode konnten 7 Stoffwechselprodukte des Spironolacton festgestellt und auf Grund der R_f-Werte, Farbreaktionen und Fluoreszensspektren charakterisiert werden. Ihre Identifizierung ist noch im Gange. Die ermittelten Metaboliten des Spironolactons kommen sowohl nach oraler als auch nach rectaler Applikation im Harn vor.

Summary

Thin-Layer Chromatographic Studies of 3'-(3-Oxo-7α-acetylthio-17β-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-propionic acid γ-lactone and Its Metabolites in Man

Thin-layer chromatographic analytic methods were devised for the detection of 3'-(3-oxo-7α-acetylthio-17β-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-propionic acid γ-lactone (Spironolactone; Aldactone®) and its metabolites in urine. It was also possible to separate chromatographically Spironolactone and its des-thioacetyl-Δ_6-derivative Aldadien. Using the methods described, 7 metabolites of Spironolactone could be detected and characterised on the bases of R_f values, colour reactions and fluorescent spectra. Identification of these metabolites is in progress. The metabolites detected occur in the urine when Spironolatcone is administered either orally or rectally.

Literatur

[1] Bauer, G., Rieckmann, P. u. Schaumann, W., Arzneim.-Forsch. **12**, 487 (1962)
[2] Bailey, R. E., Endocrinology **67**, 807 (1960)
[3] Bayley, T. A., Forbath, P. G., Wilson, J. K., and Higgins, H. P., Canad. med. Ass. J. **87**, 1263 (1962)
[4] Betzien, G., Therap. d. Monats **10**, 246 (1960)
[5] Brecht, W. u. Schneider, H., Med. Welt Nr. **5**, 263 (1962)
[6] Cella, J. A. and Kagawa, C. M., J. Amer. chem. Soc. **79**, 4808 (1962)
[7] Davidson, E. T., Devenuto, F., and Westphal, U., Endocrinology **71**, 893 (1962)
[8] Fukuchi, S., Shiojo, R., and Abe, S., Tohoku J. exper. Med. **76**, 195 (1962)
[9] Funck, F.-W. u. Zicha, L., Med. exp. **7**, 1 (1962)
[10] Gantt, C. L., in: The Clinical Use of Aldosteron Antagonists. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield/Illinois (USA), p. 133 (1960)
[11] Gantt, C. L., Metabolism **11**, 1061 (1962)
[11b] Gerhards, E. N., Engelhardt, R., Arzneim.-Forsch. **13**, 972 (1963)
[12] Ghirighelli, L. e Comoli, G., Minerva med. **53**, 1760 (1962)
[13] Gochman, N. and Gantt, C. L., J. Pharmacol. exp. Ther. **135**, 312 (1962)
[14] Graziani, G. e Mole, R., Minerva Med. **53**, 455 (1962)
[15] Hiemeyer, V. u. Kähler, H. J., Klin. Wschr. **40**, 786 (1962)
[16] Hollander, W., Chobanian, A. V., and Williams, R. W., in: The Clinical Use of Aldosteron Anta-

gonists, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield/Illinois (USA), p. 169 (1960)
[17] Iff, H. W., Experientia **18**, 374 (1962)
[18] Kagawa, C. M., Cella, J. A., and Van Arman, C. G., Science **126**, 1015 (1957)
[19] Kagawa, C. M., in: The Clinical Use of Aldosteron Antagonists, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield/Illinois (USA) p. 33 (1960)
[20] Krück, F. u. Hild, R., Klin. Wschr. **38**, 962 (1960); **39**, 178 (1961)
[21] Krück, F., Med. Welt Nr. **13**, 687 (1962)
[22] Laragh, J. H., in: The Clinical Use of Aldosteron Antagonists, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield/Illinois (USA), p. 57 (1960)
[23] Liddle, G. W., Arch. Int. Med. **102**, 998 (1958)
[24] Liddle, G. W., in: The Clinical Use of Aldosteron Antagonists, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield/Illinois (USA), p. 14 (1960)
[25] Lockwood, C. H., Canad. med. Ass. J. **85**, 631 (1961)
[26] Longo, L. D. and Assali, N. S., Surg. Gynec. Obstet. 110, 673 (1960)
[27] Lupulescu, A., Nicolescu-Catargi, A., and Neacsu, C., Acta biol. med. germ. **6**, 482 (1961)
[28] Manning, R. T. and Behrle, F. C., J. amer. med. Ass. **176**, 769 (1961)
[29] Mills, J. N., Thomas, S. and Williamson, K. S., J. Endocrin. **23**, 357 (1962)
[30] Morrison, R. S., in: The Clinical Use of Aldosteron Antagonists, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield/Illinois (USA), p. 90 (1960)
[31] Neumayr, A., Thumb, N. u. Tretenhahn, W., Wien Z. inn. Med. **43**, 375 (1962)
[32] Ofstad, J. u. Sigstad, H., Nord. Med. **67**, 21 (1962)
[33] Rechenberg, v. H. K., in: Butazolidin, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1961
[34] Richter, R. H. H. u. Arnold, M., Gynaecologia **152**, 248 (1961)
[35] Scheiffarth, F. u. Zicha, L., 1st Internat. Congr. on hormonal steroids, Milan (1962)
[36] Scheiffarth, F., Zicha, L., Funck, F.-W. u. Engelhardt, M., Acta endocrin. **43**, 227 (1963)
[37] Shaldon, S., McLaren, J. R., and Sherlock, S., Lancet I, 609 (1960)
[38] Siegenthaler, W., Truninger, B., Bächtold, H., Rhomberg, F. u. Siegenthaler, G., Schweiz. med. Wschr. **91**, 105 (1961)
[39] Stahl, E., Chemikerzeitung 82, 323 (1958)
[40] Stahl, E., Pharm. Rundschau **2**, 1 (1959)
[41] Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumsbuch, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962
[42] Stewart, W. K. and Constable, L. W., Lancet I, 523 (1961)
[43] Tublin, I. N. and Berman, L. B., J. of the Amer. Med. Ass. **174**, 869 (1960)
[44] Zicha, L., Scheiffarth, F., Bergner, D. u. Engelhardt, M., Vortrag 4th Acta endocr. Congr. Genf (1962); Acta endocr. (Kbh) Suppl. **67**, 94 (1962)
[45] Zicha, L., Scheiffarth, F., Bergner, D. u. Eyselein, U., Internat. Symp. on adrenal cortex and adrenal cortical hormones, Gent 1962
[46] Zicha, L. u. Weist, F., Diskussion z. Vortrag Neher, Deutsch. endocrinol. Symp. März 1962; Internat. Symp. on adrenal cortex and adrenal cortical hormones. Gent 1962
[47] Vander, J., Malvin, R., Wilde, W., Lipides, J., Sullivan, L., and McMurray, V., Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. **99**, 323 (1958)

[48] Veyrat, R., Engel, E., Ducommun, P. u. Muller, A. F., Schweiz. med. Wschr. **90**, 494 (1960)
[49] Veyrat, R., Engel, E., Ducommun, P. u. Muller, A. F., Helv. med. Acta **27**, 683 (1960)

Für die Verff.: Dr. L. Zicha, Medizinische Universitätsklinik, 852 Erlangen, Krankenhausstraße 12

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger, Verlag: Editio Cantor, 796 Aulendorf i. W. Ruf: Aulendorf (07525) 431. — Druck: Vereinigte Buchdruckereien, A. Sandmaier & Sohn, 7952 Bad Buchau.
Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Halbjahr (6 Hefte) 33,— DM einschl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 6,— DM einschl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung. Auslandsabonnements errechnen sich einschließlich Versand auf der Basis von 72,— DM pro Jahr.

Lebenslauf

Als Sohn des städtischen Verwaltungsdirektors Hans Weist und seiner Ehefrau Maria, geb. Übel, kam ich am 24. 9. 1938 in Nürnberg zur Welt.

Von 1944 bis 1947 besuchte ich die Volksschule, ab 1947 die Rudolf-Steiner-Schule in Nürnberg, um dann im Jahre 1957 meine Schulzeit mit einem Gastabitur am Realgymnasium abzuschließen.

Seit dem Wintersemester 1957/58 war ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Fachrichtungen Medizin und Chemie immatrikuliert. Im Sommersemester 1958 bestand ich dort das Vorphysikum, im Sommersemester 1960 die ärztliche Vorprüfung.

Ich habe während des Wintersemesters 1963/64 hier das medizinische Staatsexamen bestanden und möchte jetzt das begonnene Studium der Chemie zu einem Abschluß bringen.